

· 调查报告 ·

贵州省及部分周边地区牛博尔纳病病毒感染的情况调查*

刘海军,王长明,谢婷婷,王顺旺,徐平[△]

(遵义医学院附属医院神经内科,贵州遵义 563003)

摘要:目的 探讨贵州省及周边地区牛群博尔纳病病毒(BDV)感染状况。方法 采用荧光定量巢式逆转录聚合酶链反应(FQ-nRT-PCR)检测了 120 例牛的外周血单个核细胞中的 BDV p24 基因片段。结果 牛外周血单个核细胞(PBMCs)中 BDV p24 基因片段阳性率均为 4.17%。牛 BDV p24 基因片段的测序结果与 GeneBank 提供的标准病毒株比较,同源性 96.51%~97.67%;有 2 个位点出现一致性沉默突变(nt1675 C-T,nt1678 T-C 突变率为 2%);与马的 Strain V 病毒株比较,有 3 个位点出现一致性沉默突变(nt1650 T-C,nt1671 C-T,nt1674 C-T 突变率为 3%);与 H1766 病毒株比较,有 2 个位点出现一致性沉默突变(nt1675 C-T,nt1678 T-C 突变率为 2%);与 He80/FR 病毒株比较,在 3 个位点出现一致性沉默突变(nt 1660 T-C,nt 1669 A-G,nt 1672 C-T 突变率为 3%);但它们所编码的氨基酸没有改变。结论 贵州及湖南省部分地区牛群中存在 BDV 自然感染,可能是 BDV 流行区域之一;人感染 BDV 可能具有潜在的动物源性。

关键词:Borna 病病毒;荧光定量巢式逆转录聚合酶链反应;外周血单个核细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.32.034

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)32-3296-04

Borna disease virus in blood of cattle infect detection in Gui Zhou and surrounding areas*

Liu HaiJun, Wang Changming, Xie Tingting, Wang Shunwang, Xu Ping[△]

(Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

Abstract: Objective To investigate the infection condition in cattle infected with Borna disease virus(BDV) in Guizhou province and some surrounding areas. **Methods** The p24 gene fragment of BDV-RNA in peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) from 120 cattle was detected by fluorescence quantitative nested reverse transcriptase polymerase chain reaction(FQ-nRT-PCR). **Results** The p24 gene fragment of BDV-RNA in PBMCs from cattle was 5 positive(4.17%). The homology of p24 gene fragment of BDV detected to GenBank was 96.51%—97.67%. 2 situs consistency silent mutation when compared with Bo/04W and huP2br isolated in heifer brain tissue by Watanabe Y(nt1675 C-T,nt1678 T-C mutation rate of 2%). 3 situs consistency silent mutation when compared with Strain V in horse (nt1650 T-C,nt1671 C-T,nt1674 C-T mutation rate of 3%). 2 situs consistency silent mutation when compared with H1766 in horse (nt1675 C-T,nt1678 T-C mutation rate of 2%). 3 situs consistency silent mutation when compared with He80/FR (nt 1660 T-C,nt 1669 A-G,nt 1672 C-T mutation rate of 3%). However, there was no change in the encoding amino acid residues. **Conclusion** There is BDV natural infection probably originated from cattle of Gui Zhou and surrounding areas, also probably is one of the prevalence regions of BDV. BDV might play a potential role in the development of human having correlations with animals.

Key words: Borna disease virus; fluorescence quantitative nested reverse transcriptase polymerase chain reaction; peripheral blood mononuclear cells

博尔纳病(Borna disease, BD)是 200 多年前首先在德国马匹发现的一种神经综合征。其病原体博尔纳病病毒(Borna disease virus, BDV)是一种非分节段的单股负链 RNA 病毒。起初德国和瑞士 BDV 流行的地区的研究认为, BDV 的感染仅限于农场动物(如马、羊等)和一些野生动物(如兔)感染。在老鼠和灵长类动物 BDV 模型中则发现 BDV 可经三叉神经、血液等途径传播。随着现代生物学技术的发展,越来越多的检测技术用于检测 BDV,使得易感动物的报道、流行的地理区域和人类神经精神疾病种类都在不断地增加。国内目前报道提示中国存在 BDV 的感染,目前仅有法国、日本、德国关于牛的研究,贵州省牛群中是否存在 BDV 自然感染尚未见报道。

本研究采用荧光定量巢式逆转录聚合酶链反应(FQ-nRT-

PCR)检测贵州省及邻近省份部分地区 120 头牛外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的 BDV p24 基因片段,并对 PCR 阳性产物进行基因序列测定,测序结果与国外动物来源的 BDV 分离株进行序列比较,其结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 120 头牛分别为贵州省 60 只,云南省 30 只,湖南省 30 只(对水牛和黄牛以及性别、年龄未作区分)。其中贵州省部分地区包括遵义市、贵阳市、黔东南州、毕节地区,湖南省包括湘西地区,云南省包括曲靖市、昭通市。

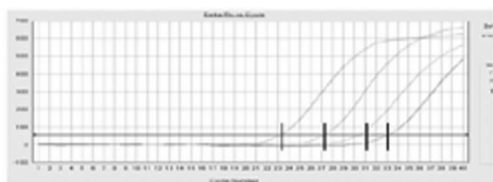
1.2 主要实验试剂来源 引物和荧光探针序列由中山医科大学达安基因诊断中心合成。感染人类的 BDV 的 ORF II (p24) 基因片段具有保守性、变异性小,因此它是检测 BDV 感染的特

异性标记物。按照荧光定量 PCR 探针设计要求,设计荧光定量 PCR 扩增 BDV p24 基因片段的探针序列为:5'-(FAM) TCA GCG GTG CGA CCA CTC CGA TAG C(TAMRA)-3' (nt1637-1661,25 bp),其中 5' 标记的荧光发光基团是 6-羧基荧光素(6-carboxy-fluorescein, FAM),3' 标记的荧光淬灭基团为四甲基罗达明(tramethyl rhodamine, TAMRA)。主要仪器为 ABI7500 荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)。

1.3 无 RNA 水解酶(RNase)处理 严格按照消除 RNase 的方法处理本实验涉及 FQ-nRT-PCR 实验的所有用品。一次性用品以无 RNase 水配制的 0.1% 焦碳酸二乙酯(DEPC)液浸泡过夜(>12 h)后,高温高压蒸汽灭菌 30 min;玻璃器皿用酸浸泡 24 h 后,洗净,180℃ 烘烤 4 h;溶液加入 DEPC 至其浓度为 0.1%,过夜后高温高压蒸汽灭菌。

1.4 PBMCs-RNA 的提取 每例采取外周血 15 mL,用 Ficoll-conray 液(天津川页生化制品公司)分离 PBMCs,TRIzol Reagent (Invitrogen 公司)提取细胞总 RNA,标本置 -70℃ 保存。

1.5 BDV 质粒标准曲线制作 将阳性重组质粒定量后作为阳性模板(浓度为 10^7 copy/ μ L),离心半径 6 000 r/min 离心数秒,吸出 5 μ L,加入稀释液 45 μ L,制成浓度为 10^6 copy/ μ L 的模板,再依次按照上述方法制成浓度 10^5 、 10^4 copy/ μ L 的模板,-20℃ 备用。在 ABI Prism(7500 型扩增检测仪)上进行 PCR 扩增,同时每 8 s 检测 1 次 PCR 产物的量(即反应管中荧光值的变化),做到了进行实时检测。反应结束后,由电脑自动分析出定量结果,并给出 PCR 扩增的动力学曲线以起始拷贝数的自然对数(Log concentration of starting templates, Logco)为横坐标,以 Ct 值(本组不同模板浓度,即 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 copy/ μ L 的 Ct 值依次对应为分别为 23.30、27.31、30.47、33.26)为纵坐标,拟合作图,可得到定量标准曲线,见图 1、2。该曲线的斜率为 -3.304 271,截距为 46.761 208,相关系数为 0.992 980,说明起始模板浓度与 Ct 值之间有良好的线性关系。



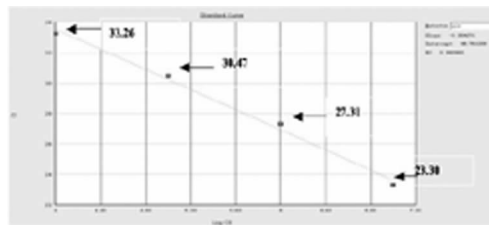
曲线斜率为 -3.304 271,截距为 46.761 2(直线方程为 $Y = -3.3X + 46.76$),相关系数为 0.992 980,说明起始模板浓度与 Ct 值之间有良好的线性关系。

图 1 FQ-PCR 测定 BDV p24 的动力学曲线图。

1.6 FQ-nRT-PCR 本研究在进行常规 nRT-PCR 时,在第 2 轮扩增的反应混合体系中加入荧光标记探针进行荧光定量 PCR(荧光定量检测试剂盒)。反应条件:93℃ 3 min,然后 93℃ 45 s,55℃ 1 min,共 40 循环。每份标本同时检 β -actin(引物序列为:上游引物 5'-ACA GGG ACC AGG CGG TGA TGG-3',下游引物:5'-CTC CAT GTG GTC CCA GTT GGT-3',探针序列为 5'-CCT CAC CGT GAA GTA CCC A-3',扩增片段大小为 237 bp)作内参照。每次实验设阴性对照。

1.7 荧光定量套式 RT-PCR 检测 BDV p24 方法稳定性和重

复性 将已配制的荧光定量 PCR 反应体系置于 -20℃,6 个月后将稀释的阳性定量模板加入其中,在 PE7500 上扩增反应,结束后观察各阳性定量标准模板扩增的 Ct 值和 6 个月前相比有无下降。



曲线斜率为 -3.304 271,截距为 46.761 2(直线方程为 $Y = -3.3X + 46.76$),相关系数为 0.992 980,说明起始模板浓度与 Ct 值之间有良好的线性关系。

图 2 FQ-PCR 测定 BDV p24 的标准曲线图。

1.8 分析结果 在 ABI7500 全自动荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)上进行。反应结束后保存检测数据文件并分析结果。

1.9 阳性 BDV p24 基因片段的凝胶电泳检测、纯化、克隆及测序 PCR 阳性产物进行凝胶电泳后用醋酸钠、乙醇沉淀法纯化后与 pMD1-T 载体连接,转化大肠杆菌,采用蓝白斑及菌落 FQ-nRT-PCR 鉴定筛选重组子,每一标本同时收集 5 个阳性菌落培养。集菌提取质粒 DNA,再用 FQ-PCR 进行鉴定,阳性质粒重组子送广州蓝博生物公司测序。

1.10 统计学处理 对阳性 PCR 产物采用纯化、克隆、测序后,与 GeneBank 提供的不同时间、地点分离的国外流行株和标准株进行同源性分析。计数结果用 SPSS16.0 统计软件包进行 Fisher 精确概率检验。

2 结 果

2.1 FQ-nRT-PCR 扩增 PBMC 中 BDV p24 基因片段的检测及结果对比分析 扩增后 120 头牛外周血 PBMCs 中 BDV p24 基因片段的检出率为 4.17%(5/120)。2 标本的扩增曲线,见图 3。

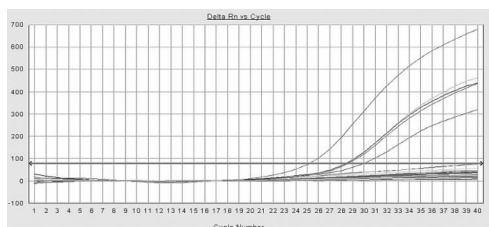


图 3 FQ-nRT-PCR 检测牛 PMBCs 中 BDV-p24 基因片段有 5 例呈 S 型曲线

2.2 阳性 PCR 产物 BDV p24 基因片段的序列测定结果及同源性分析 牛 BDV p24 基因片段的测序结果与 GeneBank 提供的标准毒株比较同源性为 96.51%~97.67%。与 Watanabe Y 在小母牛脑组织分离得到的 Bo/04W 和 huP2br 均为 2 个位点出现一致性沉默突变(nt1675 C-T,nt1678 T-C 突变率为 2%),与马的 Strain V 病毒株比较有 3 个位点出现一致性沉默突变(nt1650 T-C,nt1671 C-T,nt1674 C-T 突变率为 3%),与 H1766 毒株比较有 2 个位点出现一致性沉默突变(nt1675 C-T,nt1678 T-C 突变率为 2%),与 He80/FR 株比较在 3 个位点

出现一致性沉寂突变(nt 1660 T-C, nt 1669 A-G, nt 1672 C-T, 突变率为 3%)但它们所编码的氨基酸没有改变,见图 4、5。

2.3 BDV 系统发生树分析 把测得的牛 PBMCs 的基因序列与 Genebank 提供的国内外 30 个病毒毒株进行序列比较,绘制系统发生树。检测的牛 PBMCs 基因序列目的基因片段和 H1766 毒株及与 Watanabe Y 在小母牛脑组织分离得到的 Bo/04W 和 huP2br 病毒株核苷酸序列亲缘关系最近,同源性别为 97.67%,见图 6。

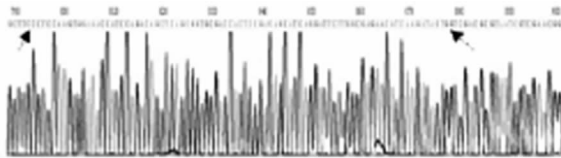


图 4 牛 PBMCs 中检出的 BDV p24 cDNA 克隆的核苷酸序列测序结果

BDV 基因组的 1609 核苷酸顺序 ↓	50	59	68	71	74	77
Strain V (马)	CCCTCCAAGTGGAAACCATCCAGACAGCTCAAGCTGACGCTTCCGAA	CTCACTCCGACAGCATCAAGGATCCTCGGCGAAGACATCAAGATACTG				
H1766	CCCTCCAAGTGGAAACCATCCAGACAGCTCAAGCTGACGCTTCCGAA	CTCACTCCGACAGCATCAAGGATCCTCGGCGAAGACATCAAGATACTG				
He80/FR	CCCTCCAAGTGGAAACCATCCAGACAGCTCAAGCTGACGCTTCCGAA	CTCACTCCGACAGCATCAAGGATCCTCGGCGAAGACATCAAGATACTG				
Bo/04W (牛)	CCCTCCAAGTGGAAACCATCCAGACAGCTCAAGCTGACGCTTCCGAA	CTCACTCCGACAGCATCAAGGATCCTCGGCGAAGACATCAAGATACTG				
huP2br (牛)	CCCTCCAAGTGGAAACCATCCAGACAGCTCAAGCTGACGCTTCCGAA	CTCACTCCGACAGCATCAAGGATCCTCGGCGAAGACATCAAGATACTG				
BDVp24 (牛)	CCCTCCAAGTGGAAACCATCCAGACAGCTCAAGCTGACGCTTCCGAA	CTCACTCCGACAGCATCAAGGATCCTCGGCGAAGACATCAAGATACTG				

图 5 牛 BDV p24 核苷酸序列同源性分析

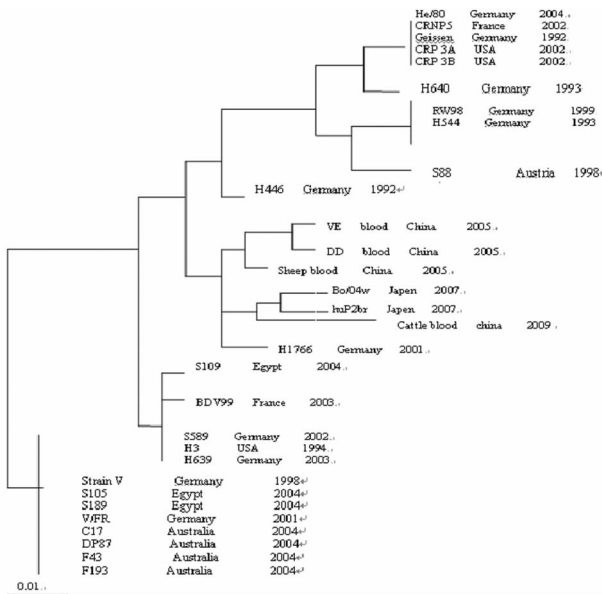


图 6 BDV 系统发生树分析

3 讨论

BDV 是一种嗜神经性的 RNA 病毒,侵入人体后可引起人的情绪、行为、认知的改变。侵入途径可能是体液分泌(如通过鼻腔或者鼻腔分泌物传播),唾液或眼结膜分泌物,直接或间接污染食物或水。在实验模型中,BDV 以密集传播的形式通过颅内、鼻腔或腹腔内播散途径侵袭到大脑。在老鼠和灵长类动物 BDV 模型中则发现 BDV 可经三叉神经、血液等途径传播。

研究证明自然或实验感染的危险动物包括大鼠、沙鼠、骆驼、恒河猴、鹿、马、牛、猫、山羊、兔、鸵鸟、狗、绵羊、羊驼、小鼠等[1],因而推断它可能感染包括人类在内的所有恒温动物。国外研究显示捷克、法国、澳大利亚、英国、日本、瑞典、芬兰、加拿

大和美国等存在动物和人的 BDV 的感染[2-4]。

国内学者用 FQ-nRT-PCR 对重庆三峡库区部分地域的 360 头家猪进行检测,阳性率为 4.44%(16/360)[5];对新疆伊犁地区 120 匹马检测阳性率为 2.5%(3/120)[6];张英英等[7]则对新疆伊犁地区 518 匹马和 206 头驴的 PBMCs 进行 BDV p24 基因片段检测,阳性率分别为 0.97%(5/518)和 1.94%(4/206)。展群玲等[8]新疆伊犁地区的 8 个品种的 150 只犬进行了 BDV p24 基因片段检测,结果显示仅有 10 只哈萨克牧羊犬为阳性,阳性率为 11.0%(10/91)。王长明等[9]用 FQ-nRT-PCR 对遵义市及周边地区 300 只山羊的 PBMCs 进行 BDV p24 基因片段检测,发现阳性率为 0.67%(20/300)。

有报道认为芬兰牛群无 BDV 感染情况。而日本 Watanabe 等[10]用酶联免疫吸附测定(ELISA)和免疫印迹法对九州岛的 101 头黑牛的外周血清样本进行了 BDV 感染的检测,结果发现 10.9%(11/101)的牛具有核蛋白(N),20.7%(21/101)的牛检测到了磷蛋白(P)。在阳性血清中,3 头母牛 2.9%(3/101)两种抗原均为阳性。法国的 Dauphin 等[11]以 nRT-PCR 法对 171 只动物(马、牛、狐狸、狗、羊)的 PBMCs 进行 BDV p24 基因片段检测,结果发现 1 例牛脑组织含有 BDV p24 基因片段。贵州省处于中国西南地区,山地多,耕地少,所以牲畜的养殖较多,人们同马、羊和牛有广泛而密切的接触。

本研究发现贵州省部分地区(遵义市、贵阳市、黔东南州、毕节地区)60 头牛的 PBMCs 中 BDV p24 基因片段阳性率为 6.67%(4/60);湖南省湘西地区 30 头牛的 PBMCs 中 BDV p24 基因片段阳性率为 3.33%(1/30);云南省部分地区(曲靖市、昭通市)牛的 PBMCs 中未检出 BDV p24 基因片段。牛 BDV p24 基因片段的测序结果与 GeneBank 提供的标准毒株比较,同源性别为 96.51%~97.67%。与 Watanabe 等[12]在小母牛脑组织分离得到的 Bo/04W 和 huP2br 毒株均为 2 个位点出现一致性沉寂突变(nt1675 C-T, nt1678 T-C 突变率为 2%);与马的 Strain V 毒株比较,有 3 个位点出现一致性沉寂突变(nt1650 T-C, nt1671 C-T, nt1674 C-T 突变率为 3%);与 H1766 毒株比较,有 2 个位点出现一致性沉寂突变(nt1674 C-T, nt1677 T-C 突变率为 2%);与 He80/FR 株比较,有 3 个位点出现一致性沉寂突变(nt 1659 T-C, nt 1668 A-G, nt 1671 C-T, 突变率为 3%),但所编码的氨基酸没有改变。因此,作者认为该 5 例牛中存在 BDV 感染。尽管所选检测的目的基因片段是 BDV 的高度保守序列,且测序结果证实与 BDV 标准病毒株相应序列有极高的同源性,但在 6 个位点出现了基因突变,说明感染牛的 BDV 存在基因多态性。提示在贵州省及湖南省份部分地区的牛中存在 BDV 的自然感染。与重庆地区、新疆部分地区及宁夏牧区的脊椎动物的阳性感染的报道接近;与王长明等[9]的遵义市及周边地区山羊的 BDV 感染结果相差较大,考虑贵州省地区的家畜中不同物种的 BDV 自然感染情况可能不同。国内马培林等[13]报道黑龙江省马 BDV 的阳性率达 23.5%,与本研究比较,马的感染率高于牛。而宁夏回族自治区的马彦[1]报道的黄牛 BDV 的阳性率达 1.5%(3/205),与本研究比较阳性率略低。本研究与各地报道的 BDV 自然感染脊椎动物结果差异原因,尚要考虑分离 PBMCs 技术的高低、不同地域的 BDV 感染率、不同发病时期检测的阳性率及不同的

检测方法。

总之,本研究证实贵州省及湖南省部分地区存在 BDV 自然感染,这些地区可能是 BDV 流行区域之一,人感染 BDV 可能具有潜在的动物源性。

参考文献:

- [1] 马彦,王振海,谢鹏,等.宁夏地区黄牛博尔纳病毒自然感染状况的探讨[J].宁夏医科大学学报,2010,32(1):22-24.
- [2] Rackova S,Janu L,Kabickova H. Borna disease virus circulating immunocomplex positivity and psychopathology in psychiatric patients in the Czech Republic[J]. Neuro Endocrinol Lett,2009,30(3):414-420.
- [3] Flower RL,Kamhieh S,McLean L, et al. Human Borna disease virus infection in australia; serological markers of infection in multi-transfused patients[J]. APMIS,2008,24(124):89-93.
- [4] Kinnunen PM,Billich C,Ek-Kommonen C, et al. Serological evidence for Borna disease virus infection in humans, wild rodents and other vertebrates in Finland[J]. J Clin Virol,2007,38(1):64-69.
- [5] 朱丹,张英英,展群岭,等.重庆三峡库区部分地域猪博尔纳病毒自然感染状况调查[J].第三军医大学学报,2009,31(21):2093.
- [6] 朱丹,曾志磊,彭丹,等.新疆伊犁地区马群中博尔纳病

毒自然感染调查[J].中华流行病学杂志,2008,29(11):1106-1109.

- [7] 张英英,展群岭,徐鸣明,等.新疆伊犁地区马和驴博尔纳病毒自然感染的调查[J].中华微生物学与免疫学杂志,2009,29(4):321-325.
- [8] 展群岭,张英英,徐鸣明,等.新疆伊犁地区不同品种犬博尔纳病毒自然感染调查[J].中华流行病学杂志,2009,30(10):993-997.
- [9] 王长明,徐平,葛均江,等.贵州遵义及周边地区 Borna 病毒感染的分子流行病学研究[J].中华流行病学,2008,29(13):1213-1216.
- [10] Watanabe Y,Yanai H,Ohtaki N, et al. Prevalence of Borna disease virus antibodies in healthy Japanese black cattle in Kyushu[J]. J Vet Med Sci,2006,68(2):171-174.
- [11] Dauphin G,Legay V,Pitel PH, et al. Borna disease: current knowledge and virus detection in France[J]. Vet Res,2002,33(2):127-138.
- [12] Watanabe Y,Ibrahim MS,Hagiwara K, et al. Characterization of a Borna disease virus field isolate which shows efficient viral propagation and transmissibility[J]. Microbes Infect,2007,9(4):417-427.
- [13] 马培林,张风民,李桂梅,等.博尔纳病毒自然感染状况及其核苷酸序[J].中国公共卫生,2004,20(4):408-410.

(收稿日期:2011-07-09 修回日期:2011-10-12)

(上接第 3295 页)

择 4 个控制测定值($n=4, r=2$),只能提供 50% 的保证, Glu 采用 $1_{2.5s}$ 规则,选择 4 个控制测定值($n=4$),能提供 90% 的保证,仅达到 4σ 左右的质量水平,这就要求必须改善现行测定方法的精密度。TC 和 BUN 测定方法的 CV 和 Bias 均较高,现行的控制规则不能提供 90% 或 50% 的保证,推荐一个最大的质量控制操作规则,即多规则 $1_{3s}/2_{2s}/R_{1s}/4_{1s}/8_x$,选择 4 个控制测定值($n=4, r=2$)较为合理,但因处于中度控制的层次,为保证质控的性能,同时还要加强非统计学质控的措施,如加强对仪器的维护、保证试剂的质量、提高技术人员的素质等,具体依照各科室的现有水平予以改进。质控方法在常规的可操作性非常重要。在常规分析中,采用 2 个以上不同浓度的质控品,在提高误差检出率的同时,可监测方法的线性,但将增加工作量和测定成本。一般常规工作中可接受是一批测定 2 个质控品,因此,选择质控规则应尽量采用测定数值数少的质控规则。以选择的质控方法能检出 90% 的系统误差,同时维持尽可能低的假失控率即可满足临床质量要求。

整体上说, 6σ 质量标准对指导实验室人员全面掌握和更深入的把握生化质量控制管理有着重要的作用。本实验室应用 6σ 质量标准对 TMS-1024i 全自动生化分析仪的部分检测项目进行分析性能评价,其结果可靠,适用于临床。依据不同项目的 σ 质量水平的高低,再结合科室的现有水平,可以对未达到 6σ 质量标准项目的质量控制方法予以改进,进一步提高检验结果的质量和速度,更好地为临床提供真实可靠的数据。

参考文献:

- [1] Westgard JO,Westgard SA. The quality of laboratory testing today: an assessment of sigma metrics for analytic quality using performance data from proficiency testing surveys and the CLIA criteria for acceptable performance[J]. Am J Clin Pathol,2006,125(3):343-354.
- [2] 刘影,彭宇生,张礼强. Olympus AU400 全自动生化分析仪总精密度评价[J]. 基层医学论坛,2009,38(10):342-343.
- [3] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:37-46.
- [4] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:79-81.
- [5] 王治国,王薇,李少男. 临床化学检验项目的 σ 水平的计算及质控方法的选择[J]. 检验医学,2009,24(1):71-73.
- [6] 张秀明,郑松柏,孙蕾,等. 应用 Westgard 方法评价决定图判断生化检测系统性能的可接受性[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(1):86-90.
- [7] 王治国. 6σ 质量标准在临床实验室质量控制的应用[J]. 上海医学检验杂志,2002,17(2):125-127.
- [8] 林增文,苏健,邹伟民,等. 广东省临床化学检验项目质量评价与数据分析[J]. 实用医学杂志,2009,25(15):2574-2576.

(收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-05-12)